PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
C12N 15/90, 15/65, 15/82

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 99/20780**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. April 1999 (29.04.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06616

(22) Internationales Anmeldedatum: 20. Oktober 1998 (20.10.98)

(30) Prioritätsdaten:
97118175.5 20. Oktober 1997 (20.10.97) EP

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112–132, D–68305 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: AUER, Johannes [DE/DE]; Birkenstrasse 29, D–82377 Penzberg (DE). SPRENGER, Raimund [DE/DE]; Färbergasse 19, D–82362 Weilheim (DE). HONOLD, Konrad [DE/DE]; Südstrasse 24, D–82377 Penzberg (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D–81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: POSITIVE–NEGATIVE SELECTION FOR HOMOLOGOUS RECOMBINATION

(54) Bezeichnung: POSITIV–NEGATIV–SELEKTION BEI DER HOMOLOGEN REKOMBINATION

(57) Abstract

The invention relates to a method for introducing a foreign DNA into the genome of a target cell by means of homologous recombination. The invention further relates to DNA constructs which are suitable for homologous recombination.

(57) Zusammenfassung

Dei Erfindung betrifft ein Verfahren zur Einführung einer fremden DNA in das Genom einer Zielzelle durch homologe Rekombination sowie für die homologe Rekombination geeignete DNA–Konstrukte.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Positiv-Negativ-Selektion bei der homologen Rekombination

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Einführung einer fremden DNA in das Genom einer Zielzelle durch homologe Rekombination sowie für die homologe Rekombination geeignete DNA-Konstrukte.

Verfahren zur Einführung fremder DNA in das Genom eukaryontischer Zellen durch homologe Rekombination sind bekannt (siehe z.B. WO 90/11354, WO 91/09955). Dabei wird eine Ausgangszelle mit einem DNA-Konstrukt transfiziert, welches mindestens eine, vorzugsweise zwei DNA-Sequenzabschnitte enthält, die homolog zu Bereichen des Genoms der zur transfizierenden Zelle sind, ein positives Selektionsmarkergen und gegebenenfalls ein negatives Selektionsmarkergen. Weiterhin kann das DNA-Konstrukt eine heterologe Expressionskontrollsequenz enthalten, wenn ein in der transfizierten Zelle normalerweise stummes Gen aktiviert werden soll. Die transfizierten Zellen werden unter Bedingungen kultiviert, bei denen eine Selektion auf das Vorhandensein des positiven Selektionsmarkergens stattfindet, welches bei Expression zu einem selektierbaren Phänotyp führt.

Um Zellen, in denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat, von Zellen zu unterscheiden, in denen nur eine zufällige Integration des Vektors in das Genom der Wirtszelle erfolgt ist, zu unterscheiden, erfolgt üblicherweise ein zweiter Selektionsschritt. Hierzu verwendet man ein negatives Selektionsmarkergen, wie etwa das HSV-Thymidinkinasegen (HSV-TK), bei dessen Vorhandensein Zellen in Gegenwart eines Selektionsmittels, z.B. Ganciclovir, zerstört werden. Bei homologer Rekombination verliert die Zelle das HSV-Thymidinkinasegen, so daß Zellen gegenüber Ganciclovir resistent sind. Zellen, in deren Genom der Targetingvektor durch zufällige, nichthomologe Integration eingebaut wurde, verlieren das HSV-TK-Gen nicht und

sind deshalb sensitiv gegenüber Ganciclovir. Für diese Art der Selektion durch HSV-TK/Ganciclovir werden vorzugsweise Zellen benutzt, die kein funktionsfähiges Thymidinkinasegen enthalten (z.B. CEM tk⁻ von Ogden Bioservices Corp., Rockville MD, USA, Kat. Nr. 491).

Andere für die homologe Rekombination verwendete Wirtzellen besitzen jedoch ein eigenes Thymidinkinasegen. Dieses zelluläre Thymidinkinasegen verursacht aber bei der negativen Selektion Hintergrundprobleme. So kann es beispielsweise beim Screening zum Verlust von homolog rekombinierten Klonen kommen. Ähnliche Probleme treten auch bei anderen negativen Selektionsmarkergenen auf, die für ein Genprodukt kodieren, gegen dessen Expression nach der Transfektion selektioniert werden muß.

Die Verwendung von an der Zelloberfläche lokalisierten Polypeptiden als positiver Transfektionsmarker ist bekannt. So beschreibt z.B. WO 95/06723 ein Verfahren zur Markierung von Zellen unter Verwendung eines partiell deletierten Zelloberflächenrezeptorgens.

Zur Vermeidung der bei den bisher verwendeten negativen Selektionsmarkergenen auftretenden Problem wird erfindungsgemäß ein negatives Selektionsmarkergen verwendet, welches für ein an der Zelloberfläche lokalisiertes Polypeptid kodiert.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Einführung von Fremd-DNA in eine Wirtszelle durch homologe Rekombination, wobei die Wirtszelle mit einem rekombinanten Vektor transfiziert wird, umfassend zwei flankierende, zu einer Zielsequenz im Genom der Wirtszelle homologe Nukleotidsequenzen, innerhalb derer sich eine für einen positiven Selektionsmarker kodierende Nukleotidsequenz befindet, und außerhalb der flankierenden Sequenzen eine für einen negativen Selektionsmarker kodierende Nukleotidsequenz, wobei die für den positiven und den negativen Selektionsmarker kodierenden Nukleotidsequenzen jeweils

operativ verknüpft sind mit einer in der Wirtszelle aktiven Expressionskontrollsequenz, wobei man als negatives Selektionsmarkergen mindestens eine für ein an der Zelloberfläche lokalisiertes Polypeptid kodierende Nukleotidsequenz verwendet, so daß nach einer Integration des DNA-Konstrukts durch homologe Rekombination in das Genom der Zelle das negative Selektionsmarkergen nicht exprimiert wird und nach einer zufälligen Integration des Vektors in das Genom der Zelle das negative Selektionsmarkergen exprimiert und dessen Genprodukt auf der Zelloberfläche präsentiert wird.

Erfindungsgemäß wird somit zur Vermeidung eines negativen Selektionsverfahrens, bei dem man mit einem für die Zelle toxischen Selektionsmittel arbeitet, ein für ein oberflächenlokalisiertes Polypeptid kodierendes negatives Selektionsmarkergen an einer entsprechenden Stelle in den Vektor für die homologe Rekombination eingesetzt. Vorzugsweise verwendet man ein negatives Selektionsmarkergen, welches für ein in der Wirtszelle normalerweise nicht vorkommendes Polypeptid kodiert.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren treten Probleme mit der Toxizität oder mit Hintergrundsignalen, wie sie im Fall der TK-Selektion beschrieben sind, nicht auf. Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß die Anzahl an transfizierten Zellen, die auf die Expression des Zielgens hin untersucht werden müssen, deutlich erniedrigt wird.

Die Wirtszelle ist vorzugsweise eine eukaryontische Zelle, besonders bevorzugt eine Säugerzelle und am meisten bevorzugt eine humane Zelle.

Zur Identifizierung und Isolierung von Zellen, in denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat, führt man erfindungsgemäß einen Selektionsschritt auf das Vorhandensein des positiven Selektionsmarkergens und einen weiteren Selektionsschritt auf die Abwesenheit des negativen Selektionsmarkergens durch.

Der Selektionsschritt auf das Vorhandensein des positiven Selektionsmarkergens kann auf übliche Weise erfolgen. Als positives Selektionsmarkergen kann man dabei ein beliebiges, insbesondere für eukaryontische Zellen geeignetes Selektionsmarkergen verwenden, welches bei Expression zu einem selektierbaren Phänotyp führt, z.B. Antibiotikumresistenz, oder Auxotrophie. Vorzugsweise werden Antibiotikumresistenzgene verwendet, z.B. das Neomycin-, Kanamycin-, Geneticin- oder Hygromycin-Resistenzgen. Ein besonders bevorzugtes positives Selektionsmarkergen ist das Neomycinphosphotransferasegen.

Das für das erfindungsgemäße Verfahren verwendete negative Selektionsmarkergen kodiert für ein Genprodukt, welches an der Oberfläche der Wirtszelle präsentiert wird, vorzugsweise für ein membranständiges Polypeptid. Bevorzugte Beispiele für solche membranständigen Polypeptide sind etwa der LNGF-, der CD24-, der LDL- oder der trk-Rezeptor oder ein membranständiges, die Ligandenbindedomäne des jeweiligen Rezeptors enthaltendes Rezeptorfragment. Geeignete Rezeptorfragmente, bei denen die intrazelluläre Domäne vollständig oder teilweise deletiert ist oder auf solche Weise modifiziert ist, daß der an der Oberfläche präsentierte Rezeptor keine Signaltransduktion bewirken kann, sind in WO 95/06723 beschrieben. Ein besonders bevorzugtes Beispiel für ein solches Rezeptorfragment ist eine Deletionsmutante des LNGF-Rezeptors (dLNGFR), bei der es sich um ein Fragment des humanen niedrigaffinen Rezeptors des Nervenwachstumsfaktors handelt, dessen intrazelluläre und signaltransduzierende Domäne deletiert wurde (WO 95/06723).

In Abbildung 1 ist schematisch das Prinzip der homologen Rekombination unter negativer Selektion durch dLNGFR gezeigt. Dieses Selektionsprinzip kann selbstverständlich auch auf andere, für oberflächenassoziierte Polypeptide kodierende Selektionsmarkergene übertragen werden. Als rekombinanter Vektor wird ein Plasmid verwendet, welches zwei flankierende zur gewünschten Zielsequenz homologe Nukleinsäureabschnitte (HR1,

HR2) und dazwischen das positive Selektionsmarkergen das Neomycinresistenzgen (NeoR) enthält. Außerhalb der beiden flankierenden homologen Nukleotidsequenzen ist auf dem Plasmid eine für dLNGFR kodierende Nukleotidsequenz angeordnet.

Bei einer homologen Rekombination mit einer Region im Bereich des Zielgens (HR) erfolgt eine Integration der Regionen HR1, NeoR und HR2 in das Genom. Die für dLNGFR kodierende Sequenz wird hingegen nicht in das Genom integriert. Im Unterschied dazu bleibt bei einer zufälligen Integration des Plasmids im Genom der Wirtszelle das dLNGFR-Gen in expressionsfähiger Form erhalten.

Die erfindungsgemäße Selektion auf die Abwesenheit des negativen Selektionsmarkergens in der transfizierten Wirtszelle umfasst vorzugsweise die Schritte:

(a) Inkontaktbringen der transfizierten Zelle mit einem Bindemolekül, das an das Genprodukt des negativen Selektionsmarkergens bindet, und

(b) Abtrennen der das gebundene Bindemolekül enthaltenden Zellen.

Als Bindemoleküle werden Substanzen verwendet, die eine spezifische und vorzugsweise hochaffine Bindung mit dem negativen Selektionsmarker eingehen können. Vorzugsweise werden solche Bindemoleküle verwendet, die keine störende Kreuzreaktivität mit anderen Oberflächenkomponenten der Wirtszelle aufweisen. Beispiele für Bindemoleküle sind Antikörper, z.B. polyklonale oder monoklonale Antikörper, Antikörperfragmente etc., die gegen das Genprodukt des negativen Selektionsmarkergens gerichtet sind. Geeignete Antikörper gegen dLNGFR sind beispielsweise aus WO 95/06723 bekannt. Bei Verwendung eines Rezeptors als negativen Selektionsmarker kann als Bindemolekül selbstverständlich auch ein natürlicher Bindepartner des Rezeptors, z.B. der Rezeptorligand, oder ein Analogon davon verwendet werden. Ein Beispiel für einen solchen Rezeptorliganden sind NGF als Ligand von LNGFR.

Um die Abtrennung der mit dem negativen Selektionsmarker markierten Zellen zu erleichtern, kann man ein Bindemolekül verwenden, welches an eine Festphase gekoppelt ist, wobei diese Koppelung durch Adsorption, kovalente Bindung oder über ein hochaffines Bindepaar (z.B. Streptavidin/-Biotin) erfolgen kann. Die Art der Festphase ist für das erfindungsgemäße Verfahren im allgemeinen nicht kritisch, vorzugsweise werden solche Festphasen verwendet, die eine leichte Abtrennung der den negativen Selektionsmarker präsentierenden Zellen von unmarkierten Zellen ermöglichen. Die Festphase kann daher beispielsweise in Form einer Chromatographiesäule vorliegen, besonders bevorzugt sind jedoch partikuläre Festphasen wie etwa Microbeads, insbesondere magnetische Microbeads, die eine besonders einfache Abtrennung erlauben.

Alternativ können die transfizierten Zellen auch mit freien Bindemolekülen in Kontakt gebracht werden. In diesem Fall tragen die freien Bindemoleküle vorzugsweise eine Markierungs- oder/und eine Festphasenbindegruppe. Beispiele für geeignete Markierungs- oder/und Festphasenbindegruppen sind Biotin, Biotinderivate, z.B. Iminobiotin, Aminobiotin oder Desthiobiotin, Haptene, z.B. Digoxigenin, Fluorescein, Enzyme, z.B. Peroxidase oder alkalische Phosphatase oder Farbstoffe, z.B. Fluoreszenzfarbstoffe wie etwa Fluorescein, Phycoerythrin, Rhodamin, Peridinin-Chlorophyll-Protein, Texasrot oder Derivate davon.

Bei Verwendung eines Bindemoleküls, welches eine Festphasenbindegruppe wie etwa Biotin, ein Biotinderivat oder ein Hapten trägt, kann die mit dem Bindemolekül markierte Zelle an eine Festphase gekoppelt werden, welche mit der Festphasenbindegruppe des Bindemoleküls reagieren kann. Bei Verwendung eines Bindemoleküls, welches eine Biotingruppe trägt, kann man beispielsweise die den negativen Selektionsmarker exprimierenden Zellen durch Bindung an eine Avidin- oder Streptavidin-beschichtete Festphase identifizieren und von unmarkierten Zellen abtrennen.

Bei Verwendung eines Bindemoleküls, welches eine enzymatische Markierungsgruppe trägt, können die den negativen Selektionsmarker exprimierenden Zellen nach Zugabe eines Enzymsubstrats durch eine enzymkatalysierte Farbreaktion identifiziert und gegebenenfalls von unmarkierten Zellen abgetrennt werden. Diese Identifizierung kann beispielsweise durch Auftragen der Zellen auf einem Objektträger und anschließende mikroskopische Analyse erfolgen.

Wenn man ein Bindemolekül verwendet, welches einen Fluoreszenzfarbstoff trägt, können die den negativen Selektionsmarker exprimierenden Zellen durch durchflußzytometrische Analyse identifiziert und von unmarkierten Zellen abgetrennt werden. Dieses Abtrennverfahren ist schnell und einfach und kann in üblichen FACS Geräten durchgeführt werden, welche das Setzen von Fluoreszenz-Fenstern und eine Zellsortierung ermöglichen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinanter Vektor, der zur Verwendung als Transfektionsvektor im erfindungsgemäßen Verfahren geeignet ist. Dieser Vektor umfaßt:

(a) zwei flankierende, zu einer Zielsequenz in einer Zelle homologe Nukleotidsequenzen,

(b) eine für einen positiven Selektionsmarker kodierende Nukleotidsequenz unter Kontrolle einer in der Zelle aktiven Expressionskontrollsequenz, die sich innerhalb der zwei flankierenden Sequenzen gemäß (a) befindet,

(c) eine für einen negativen Selektionsmarker kodierende Nukleotidsequenz unter Kontrolle einer in der Zelle aktiven Expressionskontrollsequenz, die sich außerhalb der flankierenden homologen Nukleotidsequenzen befindet und deren Expressionsprodukt ein an der Zelloberfläche lokalisiertes Polypeptid ist.

Wenn der rekombinante Vektor zur Aktivierung eines in der Wirtszelle endogen vorliegenden Gens eingesetzt werden soll, enthält er zwischen den

zwei flankierenden homologen Nukleotidsequenzen noch eine heterologe Expressionskontrollsequenz, die in der Wirtszelle aktiv ist. Diese Expressionskontrollsequenz umfasst einen Promotor und vorzugsweise weitere expressionsverbessernde Sequenzen, z.B. einen Enhancer. Der Promotor kann ein regulierbarer oder ein konsitutiver Promotor sein. Vorzugsweise ist der Promotor ein starker viraler Promotor, z.B. ein SV40- oder ein CMV-Promotor. Besonders bevorzugt ist der CMV-Promotor/Enhancer.

Wenn eine Amplifikation des Zielgens in der transfizierten Wirtzelle gewünscht wird, enthält der rekombinanter Vektor ein Amplifikationsgen zwischen den beiden flankierenden Sequenzen. Beispiele für geeignete Amplifikationsgene sind Dihydrofolatreduktase, Adenosindeaminase, Ornithindecarboxylase etc. Ein besonders bevorzugtes Amplifikationsgen ist das Dihydrofolatreduktasegen, insbesondere ein für eine Dihydrofolatreduktase-Arginin-Mutante kodierendes Gen, die eine geringere Sensitivität für das selektive Agens (Methotrexat) besitzt als das Wildtyppolypeptid (Simonsen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983), 2495).

Die für den negativen Selektionsmarker kodierende Nukleotidsequenz kann - wie zuvor erläutert - vorzugsweise aus membranständigen Rezeptoren oder membranständigen, die Ligandenbindedomäne des jeweiligen Rezeptors enthaltenden Rezeptorfragmenten ausgewählt werden.

Die flankierenden, zu einer Zielsequenz homologen Nukleotidsequenzen können aus beliebigen chromosomalen Bereichen des Genoms der zu transfizierenden Zelle, die vorzugsweise eine eukaryontische Zelle, besonders bevorzugt eine Säugerzelle und am meisten bevorzugt eine humane Zelle ist, ausgewählt werden. Bei humanen Zellen werden die flankierenden homologen Nukleotidsequenzen vorzugsweise aus dem Bereich der Gene für humane Faktoren, z.B. EPO, tPA, G-CSF, GM-CSF, TPO, Interleukinen, Interferonen, Wachstumsfaktoren, Insulin, insulinartigen Wachstumsfaktor etc. stammen.

Die flankierenden homologen Nukleotidsequenzen können den kodierenden Bereich des Zielgens oder einen Teil davon umfassen. In diesem Teil können sie so ausgewählt werden, daß sie bei homologer Rekombination eine Mutation im kodierenden Bereich des reifen Zielpolypeptids gegenüber der endogen in der Zelle vorliegenden Sequenz verursachen. Diese Mutation kann Substitutionen, Deletionen und Insertionen einzelner Aminosäuren oder ganzer Aminosäureabschnitte umfassen.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von membranständigen Oberflächenrezeptoren als negativer Selektionsmarker in einem Verfahren der homologen Rekombination.

Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele und Abbildungen erläutert. Es zeigen:

Abbildung 1:	Eine schematische Darstellung des Prinzips der homologen Rekombination unter erfindungsgemäßer Verwendung einer negativen Selektion durch dLNGFR,
Abbildung 2:	die Restriktionskarte des Plasmids pSV-dLNGFR,
Abb.3a und b:	Ergebnisse einer FACS-Analyse von dLNGFR exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen,
Abbildung 4:	die Restriktionskarte des Plasmids p187-dLNGFR,
Abbildung 5:	das Ergebnis einer FACS-Analyse zur Unterscheidung von dLNGFR negativen und positiven Zellen,

Beispiele

Methoden

<u>Rekombinante DNA-Technik</u>

Zur Manipulation von DNA wurden Standardmethoden benutzt, wie sie bei Sambrook, J. et al. (1989) in: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, beschrieben sind. Die verwendeten molekularbiologischen Reagenzien wurden nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

Transfektion von humanen Zellinien, Kultivierung und Klonierung

Der Vektor lag gelöst in einer Konzentration von 1 µg/µl bidestilliertem Wasser vor. Um eine hohe Transfektionseffizienz zu gewährleisten, wurden die Zellen mit Hilfe der Elektroporation (BioRad, Genepulser™) unter zuvor als optimal bestimmten Bedingungen transfiziert (960 µF/260 MV/18-22 µS). Als eine geeignete Zellinie wurde die adhärent wachsende humane Fibrosarkomlinie HT1080 (ATCC CCL 121) in einer Konzentration von 10^7 Zellen/0,8 ml eingesetzt. Vor und nach der Transfektion wurden die Zellen für ca. 10 min auf Eis gehalten, um die Zellmembran wieder zu rekonstituieren.

Transfektierte Zellen wurden in T-175 Kulturflaschen ausgesät und bei 37°C und 7% CO_2 im Brutschrank kultiviert. Nach 24 h wurde Selektionsdruck durch Zugabe von G418 (0,8 µg/ml) angelegt.

Nach 14 Tagen in Kultur zeigten sich resistente Klone in der Kulturschale. Nachdem größere Foci ausgewachsen waren, wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und als Einzelzellsuspension gefärbt.

FACS-Analyse

Die Färbeschritte wurden mit 10^5 Zellen/Ansatz auf Eis durchgeführt. Der als Primärantikörper zugegebene Anti-dLNGFR-Antikörper aus der Maus wurde durch Zugabe eines Sekundär-Antikörpers aus der Ziege detektiert (α-mIgG-FITC, 1:25, Caltag). Als Kontrolle für unspezifische Bindung wurden

die Zellen mit dem Sekundär-Antikörper allein angefärbt. Tote Zellen wurden durch Zugabe von Propidiumiodid (10 µg/ml) detektiert. Die Analysen wurden auf einem FACS-Vantage (Fa. Becton Dickinson) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die spezifische Fluoreszenz der dLNGFR-exprimierenden Zellen wurde im FL-1 Kanal, die toten Zellen im FL-3 Kanal erfaßt.

Beispiel 1

Herstellung des Expressionskonstrukts für dLNGFR

Das Gen für dLNGFR (WO 95/06723, Boehringer Mannheim GmbH), das 965 Bp umfaßt, wurde mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert. Durch die verwendeten Primer wurden an beiden Enden Schnittstellen für die Enzyme EcoRI bzw. SalI eingeführt. Nach der Amplifikation wurden die PCR-Fragmente mit beiden Enzymen geschnitten.

Der Vektor pSV1, der den frühen SV40 Promotor und das SV40 polyA-Signal enthält (Okayama und Berg, Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 280-289; Mulligan und Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072-2076) wurde ebenfalls mit EcoRI und SalI geschnitten. Der isolierte Vektor besitzt eine Größe von 3490 Bp. Das dLNGFR-Fragment wurde in den Vektor pSV1 ligiert. Das Gen für dLNGFR steht unter der Expressionskontrolle des frühen SV40 Promotors und des SV40 Poly-Signals. Die gesamte Expressions-kassette umfaßt 1900 Bp. Der resultierende Vektor pSV-DLNGR ist in Abb. 2 dargestellt.

Beispiel 2

Test der Expressionskassette auf Funktionalität

Zellen der Linie HT1080 wurden mit dem Plasmid pSV-DLNGFR wie oben beschrieben transient transfiziert. Nach zwei Tagen Wachstum wurden die Zellen auf Expression von dLNGFR mit Hilfe des monoklonalen Anti-dLNGFR-Antikörpers analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3 wiedergegeben, die zeigt, daß dLNGFR-exprimierende und nicht-exprimierende Zellen durch FACS-Analyse unterscheidbar sind. Sie zeigt weiter, daß die Reaktion des Anti-dLNGFR-Antikörpers spezifisch ist für transfizierte Zellen.

Beispiel 3

Klonierung des dLNGFR-Expressionskassette in einen Gentargetingvektor

Die dLNGFR-Expressionskassette wurde mit den Restriktionsenzymen NotI und PvuII aus pSV-DLNGFR isoliert. Der Targetingvektor 'p187' für das humane EPO-Gen (beschrieben in EP 97 112 649.5 und EP 97 112 640.5 siehe Abb. 4b) wurde mit NotI und EcoRV geschnitten. Das 14551 Bp große Vektorfragment wurde isoliert und mit der dLNGFR-Expressions-kassette ligiert (Abb.4) Das resultierende Plasmid 'p187-DLNGFR' wurde in E.coli transferiert und darin propagiert.

Beispiel 4

Test auf negative Selektion im FACS-Scan

HT1080-Zellen wurden mit p187-DLNGFR transfiziert und auf stabile Integration selektiert, d.h. 24 Stunden nach der Transfektion wurde G418 zum Medium zugegeben. Die erste FACS-Analyse wurde nach ca. 3 Wochen Wachstum durchgeführt und zwar nach der Bildung erster Foci, deren Zellen gepoolt wurden. Wie in Abbildung 5 gezeigt, können nach dieser Zeit dLNGFR-negative Zellen, hier 14% der Population, von den dLNGFR-exprimierenden Zellen durch FACS-Analyse unterschieden werden.

In dieser Zellpopulation befinden sich neben dem selten auftretenden Ereignis der homologen Rekombination auch solche Zellen, die eine zu geringe Rezeptordichte auf ihrer Oberfläche aufweisen und daher vom Nachweissystem nicht erkannt werden. Auf diese Weise kann jedoch die Anzahl der Klone, die anschließend auf Expression des Zielgens getestet werden müssen, deutlich reduziert werden (hier 14 von 100%).

Befindet sich in einem Transfektionsansatz kein Klon, der den Targetingvektor homolog rekombiniert vorliegen hat, so kann dieser Umstand im Vergleich zum konventionellen Screening ohne großen Arbeitsaufwand gezeigt werden. Das Fehlen homolog rekombinierter Klone wird durch das Auftreten einer zu 100% mit Anti-dLNGFR-Antikörper reagierenden Population demonstriert. Das weitere Screening auf Expression des Zielgens kann dann entfallen.

Ansprüche

1. Verfahren zur Einführung fremder DNA in eine Wirtszelle durch homologe Rekombination, wobei die Wirtszelle mit einem rekombinanten Vektor transfiziert wird, umfassend zwei flankierende, zu einer Zielsequenz im Genom der Wirtszelle homologe Nukleotidsequenzen, innerhalb derer sich eine für einen positiven Selektionsmarker kodierende Nukleotidsequenz befindet, und außerhalb der flankierenden Sequenzen eine für einen negativen Selektionsmarker kodierende Nukleotidsequenz, die jeweils operativ verknüpft sind mit einer in der Wirtszelle aktiven Expressionskontrollsequenz,
dadurch gekennzeichnet,
daß als negatives Selektionsmarkergen mindestens eine für ein an der Zelloberfläche lokalisiertes Polypeptid kodierende Nukleotidsequenz verwendet wird, wobei nach einer Integration des Vektors durch homologe Rekombination in das Genom der Zelle das negative Selektionsmarkergen nicht exprimiert wird und nach einer zufälligen Integration des Vektors in das Genom der Zelle das negative Selektionsmarkergen exprimiert und dessen Genprodukt auf der Zelloberfläche präsentiert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen Selektionsschritt auf das Vorhandensein des positiven Selektionsmarkergens und einen weiteren Selektionsschritt auf die Abwesenheit des negativen Selektionsmarkergens durchführt.

3. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Selektion auf die Abwesenheit des negativen Selektionsmarkergens die Schritte umfasst:

(a) Inkontaktbringen der transfizierten Zellen mit einem Bindemolekül, das an das Genprodukt des negativen Selektionsmarkergens bindet, und

(b) Abtrennen der das gebundene Bindemolekül enthaltenden Zellen.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein negatives Selektionsmarkergen verwendet wird, das für einen LNGF-, einen CD24-, einen LDL-, einen trk-Rezeptor oder ein membranständiges, die Ligandenbindedomäne enthaltendes Fragment des Rezeptors kodiert.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Bindemolekül ein Antikörper verwendet wird, der gegen das Genprodukt des negativen Selektionsmarkergens gerichtet ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Bindemolekül ein natürlicher Bindepartner des negativen Selektionsmarkers oder ein Analogon davon verwendet wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein Bindemolekül verwendet, das an eine Festphase gekoppelt ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Festphase magnetische Mikrobeads verwendet.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein Bindemolekül verwendet, das eine Markierungs- oder/und eine Festphasebindegruppe trägt.

10. Verfahren nach Anspruch 9
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierungs- oder/und Festphasenbiindegruppe ausgewählt wird aus Biotin, Biotinderivaten, Haptenen, Enzymen und Farbstoffen.

11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Biotin oder ein Biotinderivat ausgewählt aus Iminobiotin, Aminobiotin und Desthiobiotin verwendet.

12. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Enzym eine alkalische Phosphatase oder Peroxidase verwendet.

13. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Farbstoff einen Fluoreszenzfarbstoff verwendet.

14. Verfahren nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein, Phycoerythrin, Rhodamin, Peridinin-Chlorophyll-Protein oder Texasrot verwendet.

15. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß die den negativen Selektionsmarker exprimierenden Zellen durch Bindung an eine Avidin- oder Streptavidin-beschichtete Festphase identifiziert werden.

16. Verfahren nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß die den negativen Selektionsmarker exprimierenden Zellen durch eine enzymkatalysierte Farbreaktion identifiziert werden.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 oder 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß die den negativen Selektionsmarker exprimierenden Zellen durch durchflußzytometrische Analyse identifiziert werden.

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Zelle eine eukaryontische Zelle, vorzugsweise eine Säugerzelle und besonders bevorzugt eine humane Zelle ist.

19. Rekombinanter Vektor umfassend,
(a) zwei flankierende, zu einer Zielsequenz in einer Zelle homologe Nukleotidsequenzen,
(b) eine für einen positiven Selektionsmarker kodierende Nukleotidsequenz unter Kontrolle einer in der Zelle aktiven Expressionskontrollsequenz, die sich innerhalb der flankierenden Sequenzen gemäß (a) befindet, und
(c) eine für einen negativen Selektionsmarker kodierende Nukleotidsequenz unter Kontrolle einer in der Zelle aktiven Expressionskontrollsequenz, die sich außerhalb der flankierenden homologen Nukleotidsequenzen befindet und deren Expres-

sionsprodukt ein an der Zelloberfläche lokalisiertes Polypeptid ist.

20. Vektor nach Anspruch 19,
dadurch gekennzeichnet,
daß die flankierenden homologen Nukleotidsequenzen ausgewählt sind aus dem Bereich eines Gens für EPO, tPA, G-CSF, GM-CSF, TPO, ein Interleukin, ein Interferon, einen Wachstumsfaktor, Insulin oder insulinartigen Wachstumsfaktor.

21. Vektor nach einem der Ansprüche 19 oder 20,
dadurch gekennzeichnet,
daß die für den positiven Selektionsmarker kodierende Nukleotidsequenz ein Neomycin-, Kanamycin, Geneticin- oder Hygromycin-Resistenzgen ist.

22. Vektor nach einem der Ansprüche 19 bis 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß die für den negativen Selektionsmarker kodierende Nukleotidsequenz eine für einen LNGF-, CD24-, LDL-, trk-Rezeptor oder ein membranständiges, die Ligandenbindedomäne davon enthaltendes Fragment kodierende Sequenz ist.

23. Vektor nach einem der Ansprüche 19 bis 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß er innerhalb der flankierenden Sequenzen weiterhin eine heterologe Expressionskontrollsequenz enthält.

24. Vektor nach Anspruch 23,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Expressionskontrollsequenz einen CMV-Promotor umfasst.

25. Vektor nach einem der Ansprüche 19 bis 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß er innerhalb der flankierenden Sequenzen weiterhin ein Amplifikationsgen enthält.

26. Vektor nach einem der Ansprüche 19 bis 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß die flankierenden homologen Nukleotidsequenzen den kodierenden Bereich des Zielgens oder einen Teil davon umfassen.

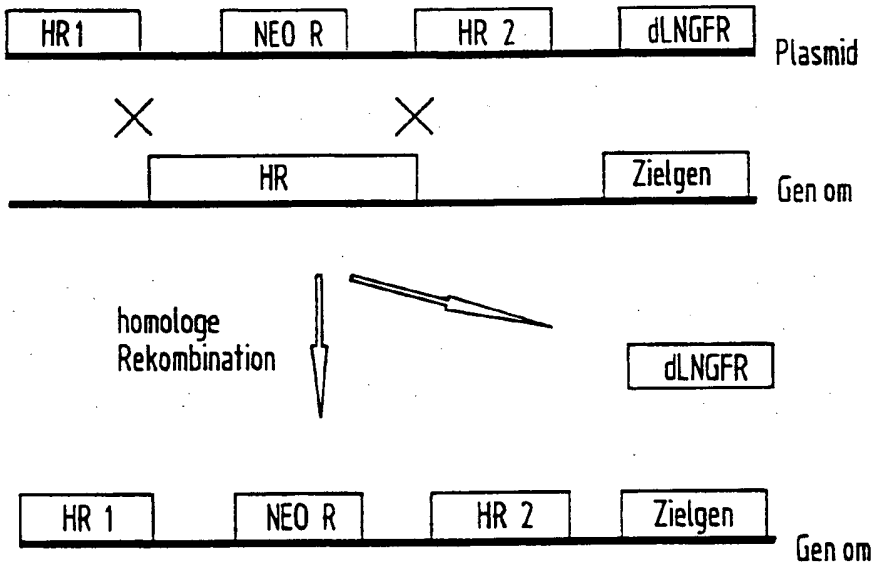
27. Vektor nach Anspruch 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß die flankierenden homologen Nukleotidsequenzen so ausgewählt sind, daß bei homologer Rekombination eine Mutation im kodierenden Bereich des reifen Zielpolypeptids auftritt.

28. Verwendung eines Vektors nach einem der Ansprüche 19 bis 27 in einem Verfahren der homologen Rekombination.

29. Verwendung von membranständigen Oberflächenrezeptoren als negativer Selektionsmarker in einem Verfahren der homologen Rekombination.

Abb. 1

Prinzip der homologen Rekombination unter negativer Selektion durch ΔLNGFR



HR: Homologieregion

Abb. 2

Restriktionskarte des Plasmids pSV-DLNGFR

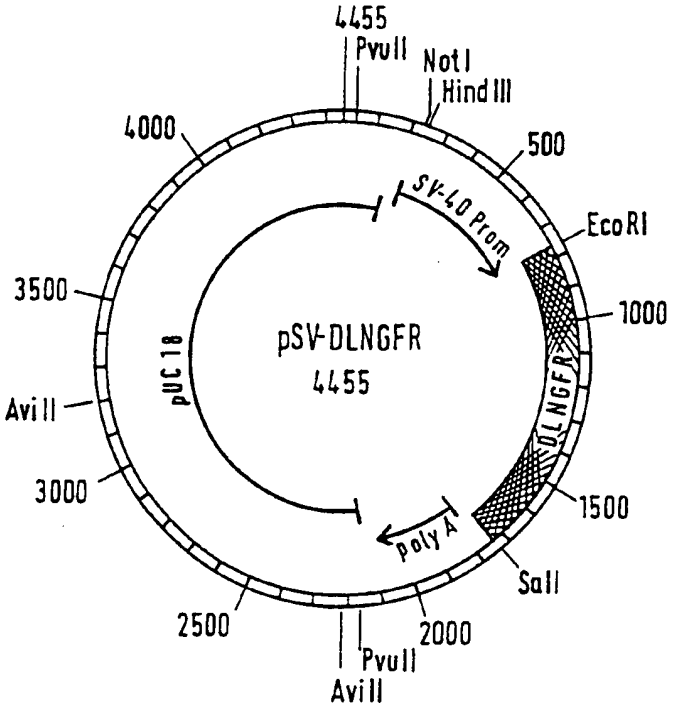
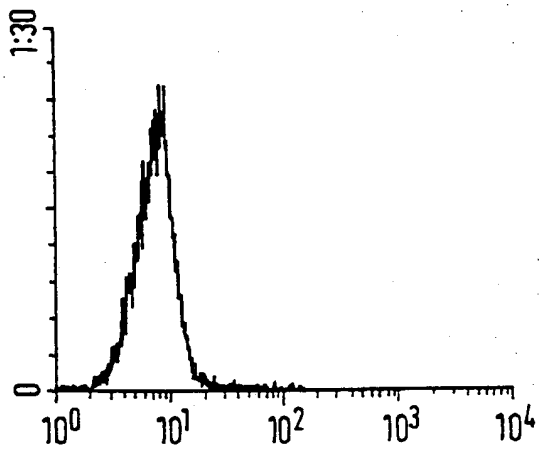
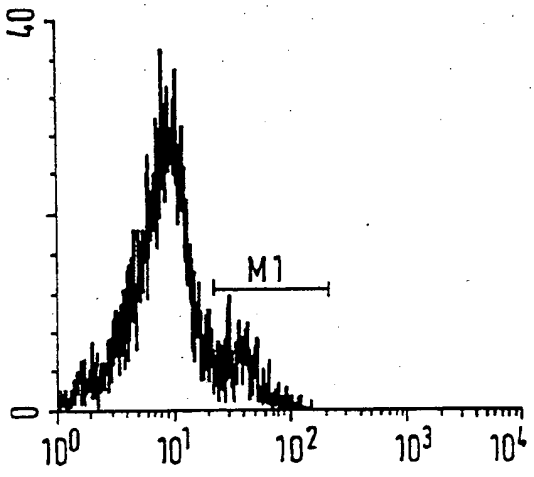


Abb. 3a



nicht transfizierte Zellen

Abb. 3b



transfizierte Zelle
(2 Tage nach Transfektion)

Abb. 4

Restriktionskarte des Plasmids 'p187-DLNGFR'.

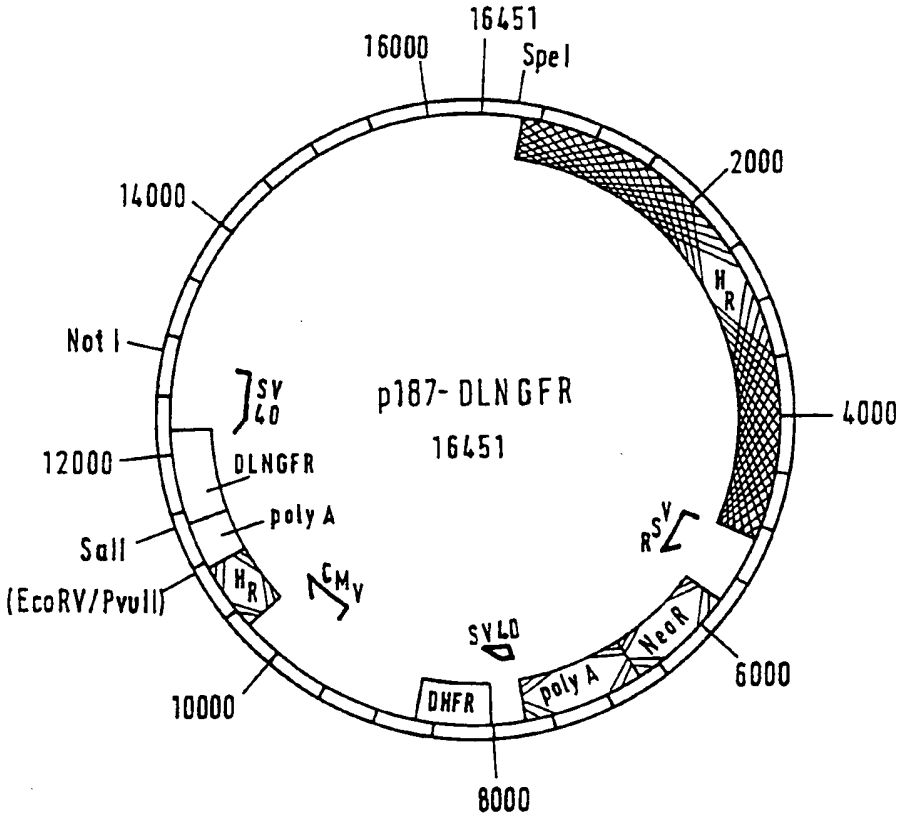
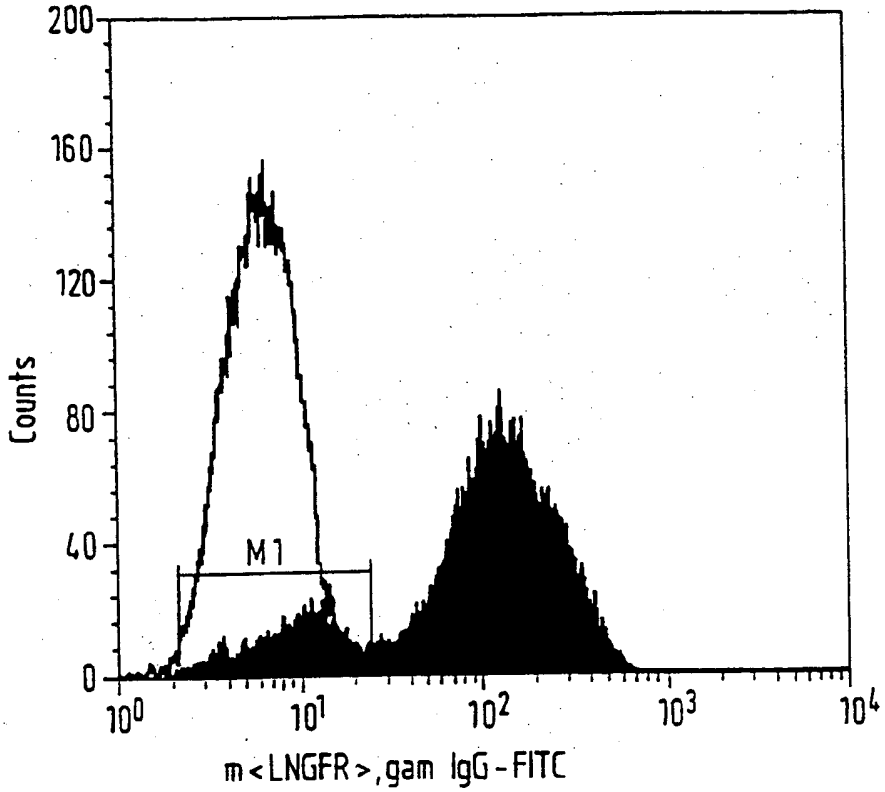


Abb. 5



Histogramm-Statistik

Probe ID: Ht-1080, 2µg LNGFR transf.
X Parameter. FL1-H m<LNGFR>,gam IgG-FITC (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	13204	100.00	66.02	133.03	87.15	75.53	114.44	126
M1	2, 24	1971	14.93	9.85	10.54	9.29	47.62	10.00	13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/06616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/90 C12N15/65 C12N15/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	US 5 464 764 A (M.R. CAPECCHI ET AL.) 7 November 1995 the whole document, in particular column 7 Lines 43- 54	1 2,3,5,6, 9,10,13, 17-21, 26-28

Y A	WO 94 29436 A (US GOVERNMENT) 22 December 1994 see page 11, line 31 - page 12, line 10 see page 24, line 32 - page 27, line 1	1 4-10,17

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 March 1999	18/03/1999

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	De Kok, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/EP 98/06616

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 06723 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 9 March 1995 cited in the application see the whole document	1-5,9, 10, 15-17, 19,22, 28,29
A	MEDIN J A ET AL: "Viral vectors for gene therapy of hematopoietic cells" IMMUNOTECHNOLOGY, vol. 3, March 1997, page 3-19 XP004075435 AMSTERDAM NL see page 7, column 2, paragraph 2 - page 8, column 2, paragraph 2	1,4,5, 18,19, 22,23
A	WO 97 08186 A (INVITROGEN CORP) 6 March 1997 see page 5, line 5 - page 6, line 16 see page 10, line 1 - page 18, line 6 see page 24, line 9 - page 25, line 16	1-10,19, 22-24
A	WO 92 09631 A (ABBOTT LABORATORIES) 11 June 1992 see abstract	1,4,5,9, 10,22
A	EP 0 455 460 A (E.R. SQUIBB & SONS INC) 6 November 1991 see the whole document	1,4-6,9, 10,19,22
A	MORELLE C: "RECOMBINAISON HOMOLOGUE ET CIBLAGE GENIQUE" BIOFUTUR., no. 134, 1 May 1994, pages 1, 3-12, XP000449127 PARIS FR see the whole document	19-29
A	EP 0 386 766 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 12 September 1990 see the whole document	19,26,27
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8939 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 89-280998 XP002096031 & JP 01 203975 A (KONICA CORP) , 16 August 1989 see abstract	10,11

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 98/06616

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5464764 A	07-11-1995	US 5487992 A	30-01-1996
		US 5627059 A	06-05-1997
		US 5631153 A	20-05-1997
WO 9429436 A	22-12-1994	AU 7052194 A	03-01-1995
		AU 8948798 A	07-01-1999
		CA 2164226 A	22-12-1994
		EP 0700430 A	13-03-1996
		JP 8511166 T	26-11-1996
		US 5858358 A	12-01-1999
WO 9506723 A	09-03-1995	IT 1261847 B	03-06-1996
		CA 2170757 A	09-03-1995
		EP 0724634 A	07-08-1996
		JP 2781276 B	30-07-1998
		JP 9501569 T	18-02-1997
WO 9708186 A	06-03-1997	AU 7253196 A	19-03-1997
		CA 2202907 A	06-03-1997
		EP 0788508 A	13-08-1997
WO 9209631 A	11-06-1992	AU 9164991 A	25-06-1992
		EP 0559834 A	15-09-1993
		JP 6503722 T	28-04-1994
EP 0455460 A	06-11-1991	CA 2040099 A	02-11-1991
		JP 6121690 A	06-05-1994
EP 0386766 A	12-09-1990	DE 3907679 A	13-09-1990
		AU 5119990 A	13-09-1990
		CA 2011784 A	09-09-1990
		JP 3201990 A	03-09-1991

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06616

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/90 C12N15/65 C12N15/82

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y A	US 5 464 764 A (M.R. CAPECCHI ET AL.) 7. November 1995 * das ganze Document, insbesondere Spalte 7, Zeilen 43-54 *	1 2,3,5,6, 9,10,13, 17-21, 26-28

Y A	WO 94 29436 A (US GOVERNMENT) 22. Dezember 1994 siehe Seite 11, Zeile 31 - Seite 12, Zeile 10 siehe Seite 24, Zeile 32 - Seite 27, Zeile 1	1 4-10,17

	-/--	

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
11. März 1999	18/03/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	De Kok, A

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06616

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 95 06723 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 9. März 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-5,9, 10, 15-17, 19,22, 28,29
A	MEDIN J A ET AL: "Viral vectors for gene therapy of hematopoietic cells" IMMUNOTECHNOLOGY, Bd. 3, März 1997, Seite 3-19 XP004075435 AMSTERDAM NL siehe Seite 7, Spalte 2, Absatz 2 - Seite 8, Spalte 2, Absatz 2	1,4,5, 18,19, 22,23
A	WO 97 08186 A (INVITROGEN CORP) 6. März 1997 siehe Seite 5, Zeile 5 - Seite 6, Zeile 16 siehe Seite 10, Zeile 1 - Seite 18, Zeile 6 siehe Seite 24, Zeile 9 - Seite 25, Zeile 16	1-10,19, 22-24
A	WO 92 09631 A (ABBOTT LABORATORIES) 11. Juni 1992 siehe Zusammenfassung	1,4,5,9, 10,22
A	EP 0 455 460 A (E.R. SQUIBB & SONS INC) 6. November 1991 siehe das ganze Dokument	1,4-6,9, 10,19,22
A	MORELLE C: "RECOMBINAISON HOMOLOGUE ET CIBLAGE GENIQUE" BIOFUTUR., Nr. 134, 1. Mai 1994, Seiten 1, 3-12, XP000449127 PARIS FR siehe das ganze Dokument	19-29
A	EP 0 386 766 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 12. September 1990 siehe das ganze Dokument	19,26,27
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8939 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 89-280998 XP002096031 & JP 01 203975 A (KONICA CORP) , 16. August 1989 siehe Zusammenfassung	10,11

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06616

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5464764 A	07-11-1995	US 5487992 A	30-01-1996
		US 5627059 A	06-05-1997
		US 5631153 A	20-05-1997
WO 9429436 A	22-12-1994	AU 7052194 A	03-01-1995
		AU 8948798 A	07-01-1999
		CA 2164226 A	22-12-1994
		EP 0700430 A	13-03-1996
		JP 8511166 T	26-11-1996
		US 5858358 A	12-01-1999
WO 9506723 A	09-03-1995	IT 1261847 B	03-06-1996
		CA 2170757 A	09-03-1995
		EP 0724634 A	07-08-1996
		JP 2781276 B	30-07-1998
		JP 9501569 T	18-02-1997
WO 9708186 A	06-03-1997	AU 7253196 A	19-03-1997
		CA 2202907 A	06-03-1997
		EP 0788508 A	13-08-1997
WO 9209631 A	11-06-1992	AU 9164991 A	25-06-1992
		EP 0559834 A	15-09-1993
		JP 6503722 T	28-04-1994
EP 0455460 A	06-11-1991	CA 2040099 A	02-11-1991
		JP 6121690 A	06-05-1994
EP 0386766 A	12-09-1990	DE 3907679 A	13-09-1990
		AU 5119990 A	13-09-1990
		CA 2011784 A	09-09-1990
		JP 3201990 A	03-09-1991